

Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS によるヒト血漿中の THC およびその代謝物の効率的な定量分析

著者

Joan Stevens, Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

複雑な生体サンプルの効率的な抽出、クリーンアップ、分析は、法医学ラボにとって大きなメリットとなります。血漿の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果の主な原因は、リン脂質 (PPL) であることがわかっています。このアプリケーションノートでは、血漿からのテトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC や THC) およびその主要代謝物、11-ヒドロキシ- Δ^9 -THC (THC-OH) および 11-ノル-9-カルボキシ- Δ^9 -THC (THC-COOH) の血漿サンプル前処理と LC-MS/MS 分析について説明します。ウェル内除タンパク処理 (PPT) の後に、Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジによるパススルークリーンアップで PPL を除去しています。Captiva EMR-Lipid カートリッジでは、よりクリーンな溶離液が生成されました。具体的には、血漿マトリックスから不要な PPL が 99% 超除去され、ターゲット化合物の回収率が 90% を超え、RSD は 10% 未満でした。1 ng/mL で THC、THC-OH、THC-COOH を分析すると、適度なシグナルノイズ比 (S/N) の理想的なピーク形状になりました。0.5 ~ 100 ng/mL の濃度範囲において直線性があり、 R^2 は 0.99 を超えました。血漿の定量下限 (Limits of Quantitation: LOQ) は 1.0 ng/g 以下でした。3 日間の実験において一貫性のある結果が得られました。

はじめに

LC-MS/MS 分析の前の効率的なサンプル前処理は、法医学ラボにおけるサンプルのルーチン分析で重要な検討事項です。サンプル前処理によってシステムの汚染を減らし、データインテグリティ、メソッド選択性、分析感度を向上させることができます。血漿中の主な干渉は、タンパク質とリン脂質 (PPL) の 2 つです。PPL は、LC-MS/MS バイオ分析におけるマトリックス効果の主要原因であることがわかっています。エレクトロスプレーイオン化 (ESI)¹ 中に形成される液滴の表面で競合するイオン化のためです。タンパク質は除タンパク処理 (PPT) などのシンプルなサンプル前処理法で簡単に除去できますが、PPL を効率的に除去することは困難です。

法医学ラボにおける一般的なサンプル前処理法としては、PPT、固相抽出 (SPE)、液液抽出 (LLE)、および保持型液液抽出 (SLE) などがあります。各手法とも、速度、コスト、生成データの品質に関する長所と短所があります。例えば PPT、LLE、SLE では PPL が除去されず、SPE を実行するには時間と手間がかかります。ただしこれらの手法の中では、PPT が最も幅広く使用されています。PPT を使用すると、アセトニトリル (ACN) やメタノール (MeOH) などの有機変性溶媒を所定の割合で生体サンプルに追加することで、タンパク質を簡単に除去できます。タンパク質が変性すると沈殿物が形成され、ろ過や遠心分離で簡単に除去できます。PPL は有機変性溶媒に溶けるため PPT でも除去されず、ろ過や遠心分離の後にもサンプルに残ります。

カンナビノイドは、法医学ラボで最も一般的なターゲット化合物の 1 つです。生体サンプルに含まれる Δ^9 -THC (THC) およびその主な代謝物である 11-ヒドロキシ- Δ^9 -THC (THC-OH) と 11-ノル-9- Δ^9 -カルボキシ-THC (THC-COOH) を迅速かつ正確に確認および定量することは、非常に重要です。ただし THC とその代謝物は、サンプル前処理中に非特異的な結合となる場合があります。

オフライン PPT、遠心分離、移送、希釈などのサンプル前処理段階を省き、タンパク質や PPL を効率的に除去してターゲット化合物を十分に回収できるサンプル前処理法が理想的です。このアプリケーションノートでは、Agilent Captiva EMR-Lipid を使用して、成分を損失することなく、シンプルなパススルークリーンアップ手順で PPT の後に PPL を除去する方法を説明します。この結果、抽出物がクリーンになり、イオン抑制の可能性と、カラムおよび質量分析計の汚染が低減します。

ウェル内 PPT で血漿から THC、THC-OH、THC-COOH を抽出した後、Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジで PPL を除去しました。その後、Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムで定量分析を実行して、EMR-Lipid カートリッジクリーンアップによる PPL 除去の効率を測定しました。THC およびその代謝物の日間 (日数 = 3) の真度、精度、および回収率も測定しました。

全血サンプルを分析するには、アプリケーションノート「Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS による全血中の THC および代謝物の効率的な定量分析」を参照してください²。

分析方法

試薬

Δ^9 -THC、11-ヒドロキシ- Δ^9 -THC、11-ノル-9- Δ^9 -カルボキシ-THC、 Δ^9 -THC-d3、11-ヒドロキシ- Δ^9 -THC-d3、および 11-ノル-9-カルボキシ- Δ^9 -THC-d9 は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。LC-MS/MS グレードのギ酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich から購入しました。すべての溶媒は LC グレード以上で、Burdick and Jackson (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

溶液

THC、THC-OH、THC-COOH のメタノール混合標準溶液を 10 ug/mL で作製しました。THC-d3、THC-OH-d3、THC-COOH-d9 の重水素化内部標準 (Internal Standard: IS) のメタノール標準溶液を 10 ug/mL で作製しました。

キャリブレーション標準と品質管理サンプル

プレススパイクした品質管理 (QC) サンプルを、適切な濃度になるまで標準溶液に 7 回添加しました。血漿中の濃度 1、10、および 50 ng/mL に対応して、低 QC (LQC)、中 QC (MQC)、高 QC (HQC) の QC サンプルを用意しました。重水素化混合溶液 (IS) は QC レベルごとに 50 ng/mL でスパイクしました。

Captiva EMR-Lipid でクリーンアップした後のブランクマトリックスを、THC とその代謝物の標準溶液で、血漿中の 1、10、および 50 ng/mL の濃度にポストスパイクしました。1.0 μ g/mL の IS 溶液の 5 μ L の分取量も追加しました。

マトリックス適合検量線を、標準溶液を使用して調製しました。Captiva EMR-Lipid で処理した後のブランクマトリックスを、抽出物で 0.5、1、5、10、50、および 100 ng/mL の濃度に対応するようにポストスパイクしました。各キャリブレーション濃度に、1.0 μ g/mL の IS を 5 μ L 追加しました。

機器および消耗品

表 1 に、分析に使用した機器と消耗品を示します。

表 1. サンプル前処理および分析用の機器と消耗品

項目	部品番号
サンプル前処理	
Agilent Captiva EMR-Lipid、1 mL カートリッジ	5190-1002
Agilent Vac Elut SPS 24 マニホールド、12 × 75 mm 試験管用コレクションラック付き	12234041
エッペンドルフピペットとリピーターピペッタ (VWR、NJ、USA)	
液体クロマトグラフィーシステム	
Agilent 1290 Infinity LC システム	G4204A
Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm 1.8 μm カラム	857768-901
Agilent 1290 Infinity シリーズサーモスタット付カラムコンパートメント	G1316C
Agilent 1290 Infinity オートサンブラ	G4226A
Agilent 1290 Infinity インラインフィルタ、0.3 μm	5067-6189
バイアルインサート 400 μL ガラス、平底、不活性処理済	5183-2086
MS 分析バイアルキット、2 mL 茶色スクリュウバイアル、ラベル付、青スクリュウキャップ、PTFE/シリコンセパタム	5190-2280
質量分析システム	
Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システム	
Agilent MassHunter ソフトウェア	

LC-MS/MS 分析

Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6490 トリプル四重極質量分析システムを組み合わせて使用しました。表 2 と表 3 に、使用した LC および MS の分析条件を示します。EMR-Lipid カートリッジクリーンアップ後のサンプル溶離液を、再希釈せずに直接注入しました。注入前に Agilent 1290 Infinity オートサンブラのオンライン希釈機能を使用しました。このとき、5 μL のサンプルの前に 10 μL の希釈 (水) を吸引し、全量を LC システムに注入しました。オンライン希釈をバイアル内でのサンプル希釈と比較した場合の利点は、サンプルの有機性を 100 % 維持できることです。このため、成分の劣化を防ぐことができます。

表 4 は、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) の採取パラメータを示します。Captiva EMR-Lipid による PPL の除去を評価するため、表 5 の MRM トランジションを使用して、11 種類の PPL 化合物をモニタリングしました。

表 2. LC 分析条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) Bonus RP 2.1 × 50 mm、1.8 μm カラム
流量	0.5 mL/min
カラム温度	50 °C
オートサンブラ温度	5 °C
注入量	5 μL
インジェクタプログラム	P2-F1 からデフォルトスピードで 10 μL 吸引し、サンプルからデフォルトスピードで 5 μL 吸引し、メソッドで指定された方法でニードルを洗浄
移動相	A) 5 mM のギ酸アンモニウムの水溶液、0.1 % FA B) 5 mM のギ酸アンモニウムのメタノール溶液、0.1 % FA
ニードル洗浄	ACN:MeOH:IPA:H ₂ O、0.2 % FA (1:1:1:1)
グラジエント	時間 (分) %B
	0.0 65
	0.1 65
	4.0 95
5.0 95	
ストップタイム	5.10 分
ポストタイム	1.5 分

表 3. MS 分析条件

パラメータ	設定値
イオン化モード	ESI
ガス温度	120 °C
ガス流量	20 L/min
ネブライザ	50 psi
シースガスヒーター	325 °C
キャピラリー電圧	3,500 V
フラグメンタ電圧	300 V
デルタエレクトロンマルチプライアの電圧 (EMV)	200 V
極性	ポジティブ

表 4. THC 化合物の MRM 採取パラメータ

化合物	プリカー サイオン	定量イオン (CE)	定性イオン (CE)	リテンションタイム (分)
THC-OH	331.23	313.2 (12)	193.1 (24)	1.70
THC-OH-d3	334.25	316.3 (12)		1.70
THC	315.23	193.2 (24)	123.0 (44)	3.05
THC-d3	318.25	196.1 (28)	28	3.04
THC-COOH	345.21	327.3 (12)	299.1 (20)	2.26
THC-COOH-d9	354.27	336.2	12	2.26

表 5. PPL 化合物の MRM 採取パラメータ

プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
808	184	30
806	184	30
786	184	30
784	184	30
760	184	30
758	184	30
704	184	30
524	184	30
522	184	30
520	184	30
496	184	30

機器コントロールとデータの定性および定量分析には、Agilent MassHunter ソフトウェアを使用しました。メソッドの日間 (日数 = 3) の真度、精度、および回収率を測定しました。

サンプル前処理手順

1. 500 μL の ACN (1 % FA) を Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジに追加します。
2. 100 μL のヒト血漿を追加します。
3. ウェル内でよく混合します。
4. 1.5 ~ 3 psi の真空に引きます。
5. 1:4 の $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ を 200 μL 追加します。
6. 全量がカートリッジを通過するまで真空に引いてから、圧力を 11 ~ 13 psi に上げて残りの溶媒を引き出します。
7. 45 °C の N_2 で蒸発させ、100 μL の MeOH (0.1 % FA) で再溶解します。
8. 5 μL + 10 μL の希釈用水を LC システムに直接注入します。

注意: 全血サンプルを分析するには、アプリケーションノート「Agilent Captiva EMR-Lipid と LC-MS/MS による全血中の THC および代謝物の効率的な定量分析」を参照してください²。

MeOH による PPT の沈殿物は ACN より細かいため、Captiva EMR-Lipid での処理の前に PPT を最大化してゲル化を防ぐには、ACN の使用を推奨します。1:3 ~ 1:5 の比率 (サンプル/溶媒) を推奨します。サンプルは変性溶媒の後に追加します。酸 (ギ酸) によってタンパク質を粉砕し、タンパク質との結合を減らすことができます。

内径の大きなピペットチップを使用して、ウェル内攪拌混合をすることを推奨します。真空圧によって Captiva EMR-Lipid カートリッジ内のフローが開始されます。最適な脂質除去のためには、3 ~ 5 秒ごとに 1 滴となるように流量を制御することを推奨します。カートリッジからサンプルが溶出すると、真空圧が上がり、サンプル回収率が最大限に高まります。

結果と考察

効率的な脂質マトリックスの除去

EMR-Lipid は、マトリックス効果を減らして分析対象物の回収率を上げるために広く使用できるシンプルな方法です。EMR-Lipid 充填剤では、サイズ排除と疎水性相互作用によって脂質が選択的にトラップされます (図 1)。枝分かれのない炭化水素鎖 (脂質) は充填剤に入りますが、枝分かれした成分は入りません。充填剤に入った脂質鎖は次に、疎水性相互作用によってトラップされます。PPL の脂質除去は 99 % を超え、高い成分回収率を達成できます。

サイズ排除: 枝分かれのない炭化水素鎖 (脂質) は充填剤に入りますが、枝分かれした成分は入りません。

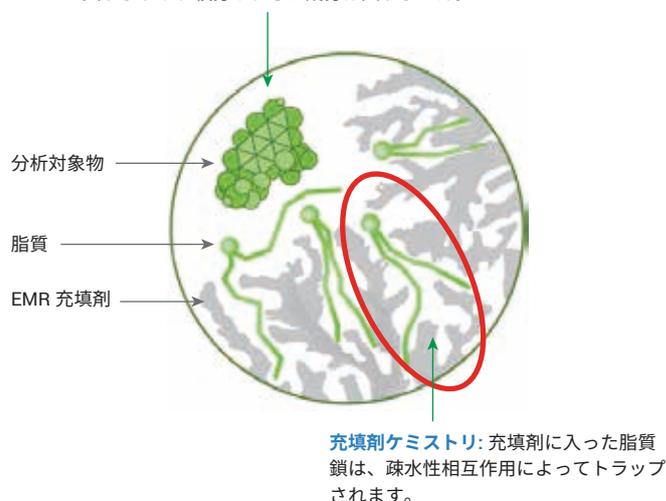


図 1. EMR-Lipid のメカニズム: サイズ排除と充填剤ケミストリ

PPL は細胞膜の主成分であり、血漿中に豊富に含まれています。PPL はリン酸とコリンから成る親水性頭部基で構成されており、疎水性尾部は長アルキル鎖で構成されています。EMR-Lipid では PPL、遊離脂肪酸、トリグリセリドなどの長炭素鎖の脂肪族化合物が保持されます。EMR-Lipid はカルボン酸、リン酸アミン、アミン、アミド、カルボニル、ヒドロキシルなどの枝分かれ鎖、短炭素鎖、官能基を持つ化合物には作用しません。

図 2 の成分 THC、THC-OH、THC-COOH には枝分かれのない炭素鎖が含まれますが、鎖が短いため、充填剤の疎水性相互作用によってトラップされません。また、枝分かれしたリング成分は充填剤によって保持されません。

EMR-Lipid 技術は 96 ウェルプレート形式または 1 mL カートリッジ形式で、高スループットを必要とするアプリケーション向けのウェル内 PPT 用に溶媒リテンションフリットが含まれています。この独自設計によって、つまりを最小限に減らすことができます。

クロマトグラフィー性能

1 ng/mL の THC、THC-OH、THC-COOH でスパイクした血漿の MRM クロマトグラム (図 3) は、ウェル内 PPT の後に EMR-Lipid カートリッジ クリーンアップをした場合のクロマトグラムを示しています。1 ng/mL の濃度であっても、マトリックス効果と干渉の減少による分離能とシグナルノイズ比 (S/N) の向上によって正確に積分され、理想的なピーク形状となっています。法医学的分析によって損傷を証明する場合、通常は 5 ng/mL での正確な検出と定量が求められます。

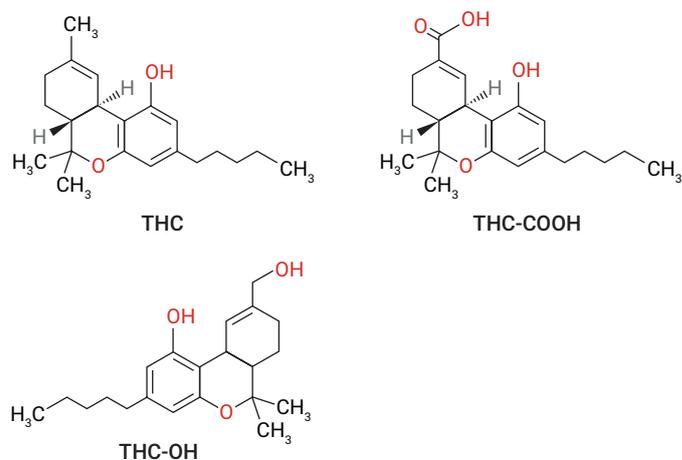


図 2. 一般的な THC 関連成分の構造

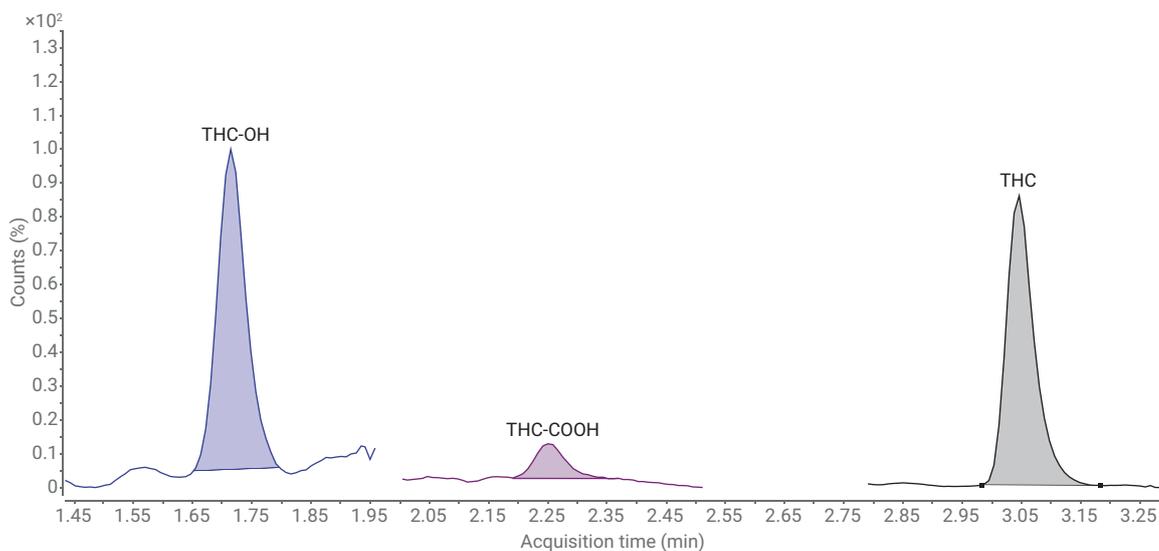


図 3. 1 ng/mL でスパイクした血漿の MRM クロマトグラム

PPL の除去

PPL は細胞膜の主成分であり、重大なマトリックス効果^{3, 4}の原因となる主要な化合物種です。グリセロホスホコリンとリゾホスファチジルコリンはそれぞれ血漿中の総 PPL の 70 % と 10 % を占めており⁵、マトリックス効果の主な原因です。Captiva EMR-Lipid による血漿からの PPL 除去の効率を測定するため、11 種類の天然 PPL 化合物をモニタリングしました。

図 4 は、抽出された血漿サンプルから 99 % の PPL が除去されたことを示しています。この一部はターゲット化合物と共溶出しています⁶。図 4 の PPL の高いアバundance (黒色のトレース、ACN、1 % FA のみによる PPT) は、検出器の飽和の可能性を示しており、定量の品質に影響する可能性があります。また PPL のアバundanceが高いと、長期的には MS システムの汚染につながる可能性があります。

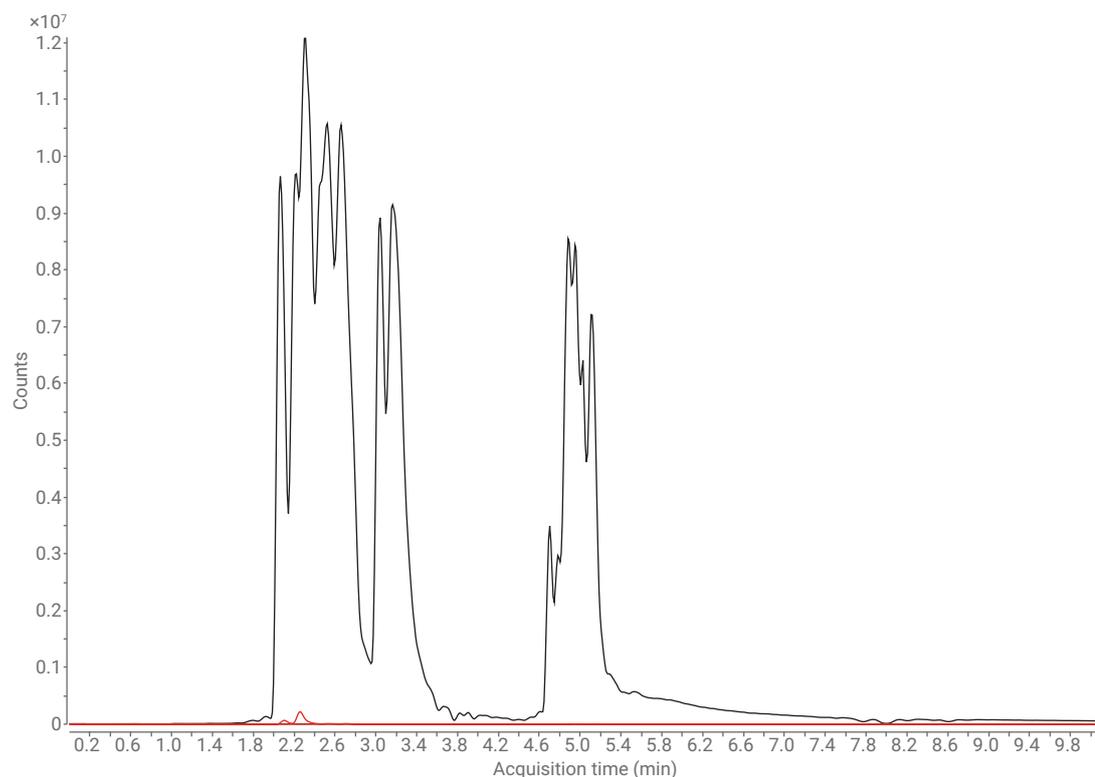


図 4. プロダクトイオン m/z 184 でモニタリングした 11 種類の PPL の MRM クロマトグラム。Agilent Captiva EMR-Lipid による除去を使用した場合が赤色、使用しない場合が黒色のトレース

定量性能

THC とその代謝物の検量線の直線性を評価しました。図 5 は、6 種類の濃度 (0.5 ~ 100 ng/mL、n = 5) の試験において、良好な直線性が得られたことを示しています。各曲線の平均決定係数 (R²) は 0.99 を超えました (0.5 ~ 100 ng/mL における直線性、直線の回帰適合、1/x の重み付け)。

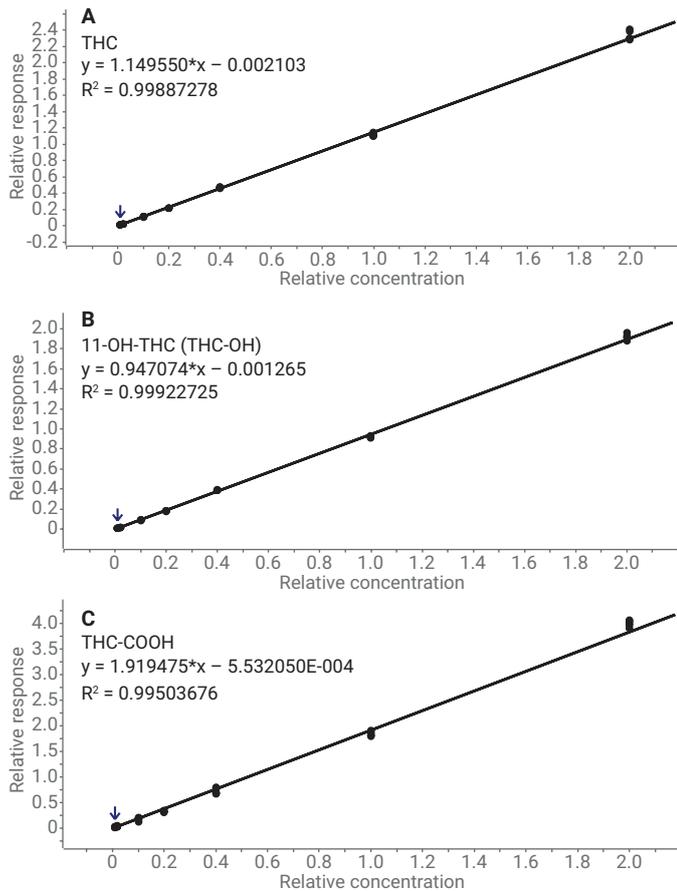
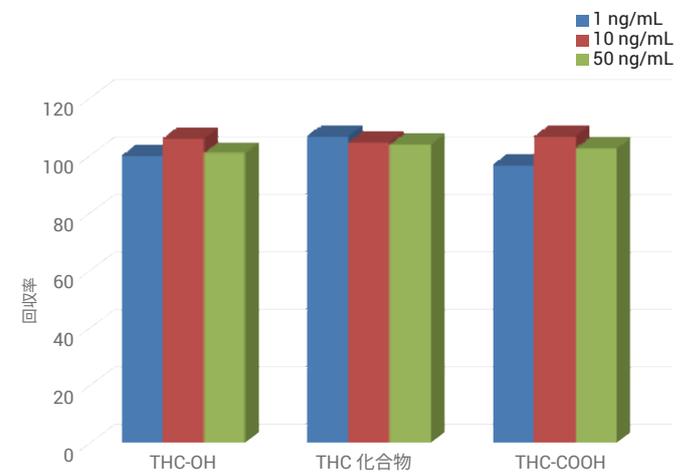


図 5. 検量線。A) THC、B) THC-OH、C) THC-COOH。
血漿中の濃度範囲 0.5 ~ 100 ng/mL、n = 5

感度は非常に高く、ターゲット化合物の血漿の LOQ は 1.0 ng/g 以下でした。メソッドの LOQ は %RSD ≤ 10 と S/N ≥ 10 に基づいています。

メソッド再現性は、血漿に標準物質を 1、10、および 50 ng/mL の濃度でスパイクし、この操作を 7 回繰り返して測定しました。図 6 の表は、%RSD が 1.2 ~ 7.6 で適度であったことを示しています。1、10、50 ng/mL での THC とその代謝物 (THC-OH および THC-COOH) の回収率は 97 % ~ 107 %、RSD は 7.6 % 未満でした (図 6)。Captiva EMR-Lipid 独自の PPL 除去メカニズムによって、十分な回収率を達成できました。他の手法では、PPL と THC などの疎水性化合物を区別できない場合があります (Log P、7.6)。

3 日間の分析で、日間のメソッド回収率と精度は一貫して良好であり、1、10、50 ng/mL で 98.6 ~ 116.9 %、RSD が 10 % 未満という結果となりました。



化合物	1 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	回収率	%RSD	回収率	%RSD	回収率	%RSD
THC-OH	100	7.6	106	1.4	101	1.4
THC	107	1.2	105	3.2	104	3.2
THC-COOH	97	5.6	107	4.2	103	4.2

図 6. 血漿中の THC と代謝物のメソッド回収率と精度 (%RSD) (1 日目)

結論

このアプリケーションノートでは、法医学用の LC-MS/MS によって、THC およびその代謝物を分析するための血漿サンプルを調製するシンプルで迅速なワークフローについて説明しました。ウェル内 PPT で血漿からターゲット化合物を抽出してから、Agilent Captiva EMR-Lipid 1 mL カートリッジクリーンアップをしました。Captiva EMR-Lipid では、血漿マトリックスから PPL の 99 % 超を除去できました。またターゲット化合物の回収率も高いものでした。サンプル抽出物は PPT のみを使用した場合よりクリーンであるため、マトリックスによるイオン抑制を減らして分析の真度、精度、再現性を上げることができました。また抽出物がクリーンであると、LC-MS/MS システムの汚染やメンテナンスのためのダウンタイムを減らすことができます。ウェル内 PPT には、サンプルの処理と移送が少ないという利点があります。

THC、THC-OH、THC-COOH を 1 ng/mL で分析し、優れたピーク形状と S/N を得ることができました。1 ng/mL は、損傷の証明に必要な濃度 (5 ng/mL) より小さい数値です。血漿中の濃度が 0.5 ~ 100 ng/mL における検量線は直線性があり、 R^2 は 0.99 を超えました。3 種類の成分の LOQ は 1.0 ng/g 以下、RSD は 10 % 未満でした。回収率も高く、90 % 以上でした。3 日間分析を繰り返し、一貫性のある結果を得ることができました。

Captiva EMR-Lipid は、既存のワークフローに簡単に組み入れることができます。また、サンプル前処理用に追加の機器やガラス器具を用意する必要もありません。Captiva EMR-Lipid は、96 ウェルプレートと 1 mL カートリッジのいずれの形式でも、自動化および高スループットアプリケーションに対応しています。フリット設計のため、つまりのない、簡単かつ効率的なサンプル溶出が可能です。

参考文献

1. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, 75(13), 3019-3030.
2. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and its Metabolites in Whole Blood Using Captiva EMR—Lipid and LC-MS/MS, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8635, **2017**.
3. Little, J. L.; Wempe, M. F.; Buchanan, C.M. Liquid chromatography—mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, 833, 219.
4. Ismaiel, O. A.; et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography—tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. *J. Chromatog. B* **2007**, 859, 84–93.
5. Chambers, E.; et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatog. B* **2007**, 852, 22-34.
6. Zhao, L.; Lucas, D.; Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8006EN, **2017**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017
Printed in Japan, November 6, 2017
5991-8636JAJP